

HPLC测定覆盆子中槲树苷和山奈酚的含量

平欲晖, 李彩丽, 谢一辉*

(江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

摘要: 建立 HPLC 测定覆盆子中槲树苷和山奈酚含量的方法。采用高效液相色谱法, SHISEIDO C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相为甲醇—0.1%磷酸水(52:48, 体积比), 流速 1 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 366 nm。覆盆子中槲树苷、山奈酚分离效果良好, 线性范围分别为 3.2 μg/mL~160 μg/mL 和 0.168 μg/mL~8.4 μg/mL。该方法准确灵敏、稳定可靠, 可用于覆盆子的质量控制。

关键词: 覆盆子; 槲树苷; 山奈酚; HPLC

Determination of Tiliroside and Kaempferol in Rubus Chingii Hu

PING Yu-hui, LI Cai-li, XIE Yi-hui*

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi, China)

Abstract: To establish a HPLC method for the determination of tiliroside and kaempferol in rubus chingii hu. The method of HPLC was used to determine the content of tiliroside and kaempferol in rubus chingii hu. The method was established on SHISEIDO C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mixture of methanol - 0.1% H₃PO₄ water (52:48) as the mobile phase. The flow rate was 1 mL/min, and the column temperature at 25℃, the detection wavelength was set at 366 nm. This method had a good separation performance for tiliroside and kaempferol in rubus chingii hu, and the linear range were 3.2 μg/mL~160 μg/mL and 0.168 μg/mL~8.4 μg/mL, respectively. This method is accurate, sensitive, stable and reliable, can be used in the quality control of raspberry.

Key words: rubus chingii hu; tiliroside; kaempferol; HPLC

覆盆子为蔷薇科植物华东覆盆子 (*Rubus chingii* Hu) 的干燥果实, 性温, 味甘、酸, 归肝、肾、膀胱经^[1], 具有益肾固精缩尿, 养肝明目的功效, 还具有抗诱变、抗氧化、改善记忆、延缓衰老、增强免疫活性、抗炎、抑菌等药理作用、用于遗精滑精、遗尿尿频、阳痿早泄、目暗昏花等症的治疗^[2-8], 还具有降血脂、降血糖的作用^[9-11]。目前, 中国药典对覆盆子药材的质量控制方法尚不完善, 尚没有检查和含量测定项。国内学者报道过用 HPLC 法测定覆盆子中的槲树苷、黄酮苷、没食子酸、芦丁等多种成分的含量^[12-14], 但还未见有学者同时测

定覆盆子中槲树苷和山奈酚两个成分的报道, 作者以槲树苷和山奈酚为指标性成分, 建立了其含量测定方法, 并对全国 11 个不同地区的覆盆子样品进行了含量测定。为覆盆子的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(VWD 检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机); 美国安捷伦公司; AE-240 型十万分之一天平: 瑞士梅特勒公司; SL-100 型高速多功能粉碎机: 浙江省永康市松青五金工具厂; HH-2 型数显恒温水浴锅: 国华电器有限公司。

覆盆子药材: 分别购于德兴、福州、浙江等 11 个地区, 经江西中医药大学刘庆华老师鉴定为蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子 (*Rubus chingii* Hu) 的干燥未成熟果实; 槲树苷对照品 (20120111)、山奈酚对照品 (201000924): 上海永恒生物科技有限公司; 甲醇为色

基金项目: 江西省科技攻关计划项目《覆盆子的炮制及其炮制品质量标准的研究》(赣科发计字[2006]38)

作者简介: 平欲晖(1969—), 女(汉), 副教授, 本科, 从事药物成分及质量控制研究。

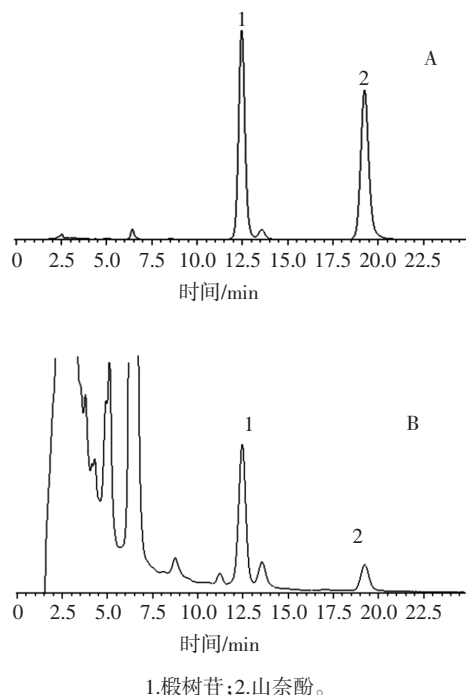
* 通信作者: 谢一辉(1958—), 男(汉), 教授, 本科, 研究方向: 中药成分及质量控制研究。

谱纯;水为三蒸水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

SHISEIDO 反相 C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸水(52:48),流速 1 mL/min,检测波长 366 nm,柱温 25℃。在此色谱条件下,鞣树苷和山奈酚色谱峰能与其他峰达到基线分离,结果见图 1。



1.鞣树苷;2.山奈酚。

图 1 混合对照品(A)和覆盆子药材样品(B)高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and the rubus chingii hu sample (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取鞣树苷对照品 9.98 mg 和山奈酚对照品 11.84 mg,至于 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得 1 mL 含鞣树苷 0.399 2 mg 的对照品溶液和 1 mL 含山奈酚 0.473 6 mg 的对照品储备液。分别吸取一定量的对照品储备液制成鞣树苷(0.032 mg/mL)山奈酚(0.001 68 mg/mL)的混合标准品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取覆盆子粉碎,过 60 目筛,精密称定称取约 1.5 g。置于圆底烧瓶中,精密加入已配制好的 80%的甲醇 30 mL,称定质量,在 80℃回流提取 1 h,取出,冷却并补重,摇匀,微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察试验

精密移取鞣树苷和山奈酚对照品母液一定体积,

用甲醇稀释成梯度浓度,所含鞣树苷分别为 3.2、19.2、25.6、28.8、32、96、160 μg/mL,山奈酚为 0.168、0.176、1.512、1.68、3.6、6.72、8.4 μg/mL。吸取不同质量浓度混合对照品溶液 20 μL,分别进样,以对照品浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,鞣树苷: $y=21\,923.45x-50.78$, $r=0.999\,9$;山奈酚: $y=9\,8342.43x-9.021\,6$, $r=0.999\,7$ 。结果表明鞣树苷和山奈酚分别在 3.2 μg/mL~160 μg/mL,0.168 μg/mL~8.4 μg/mL 范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.4.2 精密度试验

精密吸取鞣树苷(0.032 mg/mL)山奈酚(0.001 68 mg/mL)的混合对照品溶液 20 μL,按照上述色谱条件,连续进样 6 次。测得鞣树苷峰面积的 RSD 为 0.71%,山奈酚峰面积的 RSD 为 1.19%。结果表明,所用仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验

精密称取覆盆子粉末 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样分析,测得鞣树苷和山奈酚的含量分别为 504.47、23.42 μg/g,RSD 分别为 1.24%、1.05%,表明该试验重复性良好。

2.4.4 稳定性试验

取供试品溶液,分别于配制后 0、2、4、8、10、12 h 进样 20 μL,记录峰面积,结果鞣树苷和山奈酚的 RSD 分别为 1.48%、1.74%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验

准确称取已知含量的覆盆子样品 6 份,每份约 1.3 g,分别加入鞣树苷和山奈酚对照品适量,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样分析,计算回收率,结果见表 1。

表 1 覆盆子中鞣树苷和山奈酚的加样回收率

Table 1 Recovery tests of tiliroside and kaempferol in rubus chingii hu

成分	取样量/g	加入对照品量/mg	样品中的含量/mg	实测量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
鞣树苷	1.299 4	0.566 9	0.669 2	1.228 5	98.66	100.27	1.74
	1.300 3	0.566 9	0.669 7	1.244 9	101.47		
	1.301 1	0.566 9	0.670 1	1.256	103.36		
	1.299 8	0.650 7	0.669 4	1.306 4	97.90		
	1.300 5	0.650 7	0.669 8	1.326 1	100.87		
	1.300 9	0.650 7	0.670 0	1.328 6	101.22		
	1.300 4	0.846 3	0.669 7	1.506 3	98.85		
	1.300 2	0.846 3	0.669 6	1.509	99.18		
	1.300 1	0.846 3	0.669 6	1.523 8	100.94		
	1.299 4	0.025 6	0.031 1	0.056	97.44	99.25	1.48
山奈酚	1.300 3	0.025 6	0.031 1	0.056 5	99.31		

续表1 覆盆子中槲树苷和山奈酚的加样回收率
Continue table 1 Recovery tests of tiliroside and kaempferol in
rubus chingii hu

成分	取样 量/g	加入对照 品量/mg	样品中的 含量/mg	实测 量/mg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
	1.301 1	0.025 6	0.031 1	0.057 2	101.97		
	1.299 8	0.032 2	0.031 1	0.062 6	97.93		
	1.300 5	0.032 2	0.031 1	0.063 1	99.43		
	1.300 9	0.032 2	0.031 1	0.063 2	99.72		
	1.300 4	0.036 9	0.031 1	0.067 1	97.62		
	1.300 2	0.036 9	0.031 1	0.067 7	99.26		
	1.300 1	0.036 9	0.031 1	0.068 2	100.62		

2.5 样品含量测定

取不同产地覆盆子药材粉末各 1.5 g, 精密称定, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样 20 μ L, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积, 计算槲树苷和山奈酚的含量, 结果见表 2。

表 2 不同产地覆盆子中槲树苷和山奈酚含量测定结果
Table 2 The determined contents of tiliroside and kaempferol in in
rubus chingii hu of different areas

产地	槲树苷含量/(mg/g)	山奈酚含量/(μ g/g)
1 天津	0.176 9	10.3
2 福州	0.340 7	11.2
3 湖南	0.218 2	9.7
4 樟树	0.233 2	11.3
5 银川	0.197 8	16.0
6 黄庆仁	0.212 0	10.2
7 浙江	0.278 6	9.5
8 海南	0.205 6	8.2
9 贵州	0.182 0	6.7
10 同仁堂	0.319 3	11.0
11 德兴	0.515 0	23.9

3 讨论

本试验采用 HPLC 法测定了覆盆子中槲树苷和山奈酚, 方法简单、准确, 重复性好, 为覆盆子质量标准的建立提供了一定的科学依据。

本试验考察了回流、超声两种提取方法, 结果发现回流提取法有效成分含量较高, 故采用回流提取方法。回流提取时主要考察了提取溶剂(30%、50%、70%、80%、90%、100%的甲醇)、溶剂用量(5、10、15、20、25 mL)、提取时间(30、60、90、120 min)、提取温度(70、

80、90 $^{\circ}$ C), 鉴于节约溶剂、时间及有效成分的量考虑, 本实验采用的最佳提取工艺为 1.5 g 覆盆子加入到 30 mL 80%的甲醇中在 80 $^{\circ}$ C条件下回流 1 h。

高效液相色谱法的测定结果表明, 不同地区生长的覆盆子中槲树苷和山奈酚含量差异较大, 其中以德兴地区的覆盆子中槲树苷、山奈酚含量最高。所以有必要对覆盆子的种植进行规范化处理, 完善质量监管机制。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社 2010:359

[2] 付德润, 钟承民, 郭伟, 等. 覆盆子抗诱变作用的实验研究[J]. 中国全科医学杂志, 1998, 1(1): 35-37

[3] 朱树森, 张炳烈, 李文彬, 等. 覆盆子对衰老模型小鼠脑功能的影响[J]. 中医药学报, 1998(3):42-43

[4] 黄丽萍, 熊玉洁, 谢一辉, 等. 覆盆子有效部位改善肾虚型痴呆大鼠学习记忆作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19: 192-196

[5] 皮慧芳, 吴继洲. 覆盆子的化学成分与药理作用研究述要[J]. 中医药学刊, 2003(12):2169-2174

[6] 周丰宝, 杜翠翠, 王圆明. 覆盆子种子汤治疗不育症 69 例[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(6):452-453

[7] 张石群, 林辉, 苗琦, 等. 覆盆子提取物联合唑类药物抗真菌活性研究[J]. 中国真菌学杂志, 2012, 7(1):4-7

[8] Fei Xiao, Jiang Zhu, Lei Zhao, et al. Involvement of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the anti-inflammatory activity of Rubus idaeus L. on LPS-treated RAW 264.7 cells[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2010, 19(3):201-208

[9] Wang Lili, Meng Xianjun, Zhang Fengqing. Raspberry Ketone Protects Rats Fed High-Fat Diets Against Nonalcoholic Steatohepatitis. [J]. J Medicinal Food, 2012, 15(5):495-503

[10] 谢欣梅, 庞晓斌, 李晓婷. 覆盆子酮对糖尿病模型小鼠的降血糖作用及其机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(23):1899-1904

[11] 杨浩, 谢欣梅, 庞晓斌. 覆盆子酮对 HepG2 细胞胰岛素信号转导通路中 SHP-1 和 IRS-1 表达的影响[J]. 中成药, 2014, 36(8):1579-1583

[12] 柴伟, 王祝举, 唐力英, 等. HPLC 测定覆盆子中槲树苷的含量[J]. 中国中药志, 2009, 34(19):2534-2535

[13] 钟瑞建, 周国平, 付辉政, 等. RP-HPLC 法同时测定覆盆子药材中 2 个主要黄酮苷成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6):971-974

[14] 李天傲, 谭喜莹. HPLC 测定覆盆子中没食子酸含量[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(3):235-237